

УДК 579.862.1:577.113

РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АССОЦИАЦИИ *BACILLUS SUBTILIS* И *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

© 2011 г. Н. А. Ушакова¹, Е. В. Котенкова¹, А. А. Козлова¹,
Е. В. Федосов¹, Р. В. Баслеров²

¹ Институт проблем экологии и эволюции им.А.Н. Северцова РАН, Москва,

² Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

E-mail: ushakova@sevin.ru

Разработаны основы создания пробиотического препарата для животных с использованием ассоциации *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecium*. Показана возможность совместного твердофазного культивирования кишечных энтерококков (выделенного из лактирующей крольчихи штамма *E. faecalis* Rb и коллекционного штамма *E. faecium* B-8251) с *B. subtilis* B-8130 на геркулесе. Полученные препараты, включающие клетки бактерий, стимулировали развитие крольчат при введении препаратов в их рацион. Штамм *E. faecalis* Rb содержал характерные для *E. faecalis* гены вирулентности *agg*, *gelE*, *efaAfs*, что ограничивает его использование в пробиотических препаратах. В клетках *E. faecium* B-8251 обсуждаемые гены не обнаружены. Продукт совместно твердофазной ферментации *B. subtilis* B-8130 и *E. faecium* B-8251 при скармливании крольчатам стабилизировал обменные процессы и способствовал увеличению массы тела животных. Данная композиция перспективна для дальнейших исследований.

Ключевые слова: пробиотики, кролики, гены вирулентности энтерококков, рост и развитие.

ВВЕДЕНИЕ

Подбор микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ является важнейшей составляющей при разработке пробиотических препаратов. Для этих целей применяют сканирование различных коллекционных штаммов. Нами используется также подход, связанный с направленным изучением природных штаммов бактерий на основании зоологических наблюдений за поведением животных в сочетании с анализом морфологии и физиологических особенностей тех органов, секретов и экскретов, в которых развиваются симбионтные бактерии [12]. В частности, при изучении взаимодействия детенышей с лактирующей крольчихой показано, что мать активно вмешивается в отношения крольчат между собой и подавляет их агрессивные контакты [8]. В отсутствие матери высокий уровень агрессивности по отношению к другим членам группы проявляется в значительных колебаниях недельных приростов массы тела крольчат (рис. 1). Амплитуды колебаний средних недельных приростов массы тела крольчат при содержании с матерью уменьшаются, и аналогичное влияние оказывают мягкие фекалии лактирующей крольчихи при

ежедневном подкладывании их в клетки с крольчатами. Крольчиха выделяет мягкие экскременты, содержащие биомассу бактерий-симбионтов, которые поедает сама, а контактным способом экскреторная масса попадает в желудочно-кишечный тракт крольчат. Лишение животного возможности копрофагии отрицательно сказывается на физиологическом состоянии организма [20]. Из мягких экскрементов лактирующей крольчихи выделен микроорганизм, введение которого в корм крольчатам, содержащимся без матери, стимулировало у них обмен веществ [17]. Штамм идентифицирован как *Enterococcus faecalis* Rb [8].

Полученные данные согласуются с результатами, представленными в работах по медико-биологической активности кишечных энтерококков. Показана перспективность их использования как в монокомпонентных пробиотических препаратах (например, препарат Ламинолакт [1, 10], так и в сочетании с лакто- и бифидобактериями в составе поликомпонентных пробиотических препаратов (Линекс, Бифиформ) [2], а также пробиотиков метаболитного типа (Хилак-форте), в которых содержится оптимизированный набор продуктов метаболизма лактобацилл, кишечной палочки

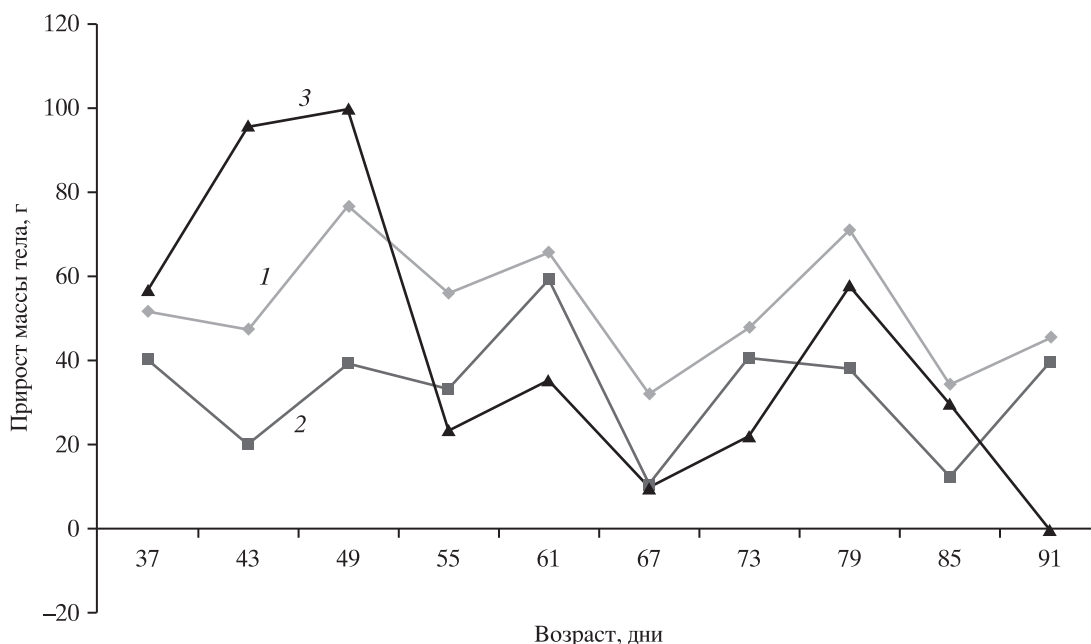


Рис. 1. Динамика средних недельных приростов массы тела крольчат: 1 – с самкой, 2 – с калом, 3 – контроль.

и фекального стрептококка: молочная кислота, аминокислоты, короткоцепочечные жирные кислоты, лактоза [11].

Энтерококки – обычные обитатели кишечника, и в норме их численность не превышает общее количество кишечных палочек. Энтерококки осуществляют метаболизм бродильного типа, ферментируют углеводы с образованием в основном молочной кислоты без газа, снижают pH до 4.2–4.6. Теоретический и практический интерес представляет изучение возможности комбинирования кишечных энтерококков с пробиотическими штаммами *Bacillus subtilis* для получения высокоэффективных кормовых добавок для сельскохозяйственных животных. Нами разрабатывается процесс получения биологически активных препаратов путем твердофазного сбраживания растительных субстратов, до некоторой степени имитирующий отдельные стадии пищеварения в слепой кишке позвоночных [13, 15, 16, 18]. В качестве рабочего штамма используется штамм *B. subtilis* B-8130, который входит в состав пробиотических кормовых добавок. Субстратами служат растительные отходы – различные типы шротов, жомы, жмыхи и др. Кишечные энтерококки обладают свойствами, указывающими на перспективность их сочетания с бациллой: они успешно развиваются в содержимом кишечника, где условия близки твердофазным, и выделяют бактериоцины [7, 22–24], которые могут повысить профилактические качества препарата, в том числе и против вирусных инфекций. В экспериментах на гнотобионтах

показана защитная роль энтерококков от развития летальной вирусной инфекции [2]. Однако многие штаммы энтерококков, являющиеся природными контаминантами пищевых продуктов, выделенные из кишечника животных и даже входящие в состав производственных заквасок, содержат вирулентные детерминанты [4, 21].

Задача настоящей работы – изучение степени безопасности выделенного из мягких фекалий крольчихи и коллекционных штаммов энтерококков и выбор наиболее перспективного штамма для получения пробиотического препарата в комбинации с *B. subtilis* B-8130 в условиях твердофазного сбраживания фитосубстрата.

МЕТОДИКА

Работа выполнена в лаборатории научно-экспериментальной базы ИПЭЭ РАН “Черноголовка”. В качестве объекта исследований использованы карликовые кролики (*Oryctolagus cuniculus*) породы “цветной карлик”.

Для генетических анализов использовали клетки бактерий *E. faecalis* Rb, выращенные на мясопептонном агаре, а также штаммы, полученные из ВКПМ: *E. faecalis* B-4610 и *E. faecium* B-8251.

Выделение ДНК из бактерий проводили по ранее описанному методу [5, 14], основанному на модифицированном методе щелочного выделения ДНК Бирнбойма–Доли [19] и Wizard-технологии фирмы “Promega” (США). Концентрация

полученных препаратов ДНК при использовании этого метода составляла 30–50 мкг/мл; РНК присутствовала в следовых количествах (менее 1%, согласно данным электрофоретического анализа). Всего было получено по два независимых препарата ДНК для каждого из исследуемых штаммов.

ПЦР генов вирулентности проводили с использованием следующих пар праймеров [3, 19], синтезированных фирмой “Синтол” (Россия):

ТЕ3-ТЕ4 (ожидаемый размер ПЦР-фрагмента 1553 п.н.) ген *agg*,

ТЕ9-ТЕ10 (ожидаемый размер ПЦР-фрагмента 419 п.н.) ген *gelE*,

ТЕ17-ТЕ18 (ожидаемый размер ПЦР-фрагмента 517 п.н.) ген *cytA*,

ТЕ5-ТЕ6 (ожидаемый размер ПЦР-фрагмента 705 п.н.) ген *efaAfs*.

Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел состав: 1 × буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgCl₂); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 94 °С × 9 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; последующие 30 циклов – 94 °С × 1 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; завершающий цикл – 72 °С × 7 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Фотографирование полученных данных проводили при помощи системы видеодокументации BioDocII, производство “Biometra”, Германия.

Безвредность выделенного штамма Rb оценивали путем наблюдений в течение 14 дней за физиологическим состоянием белых беспородных и черных СВА лабораторных мышей (n = 20) после введения в рот по 0.5 мл суспензии суточной культуры в молоке. Изучали влияние штамма на месячных лабораторных кроликов, наблюдая в течение 2 месяцев за состоянием детенышей (n = 20), в рацион которых были введены овсяные хлопья “Геркулес” производства ЗАО “Система Зерностандарт” (Россия), обогащенные клетками бактерий. Для этого на поверхность хлопьев распылением наносили суспензию 2-суточной культуры в молоке, и затем тонкий слой “геркулеса” (1–2 см) мягко высушивали на полочной сушилке при температуре 45 °С. Препараты вводили в рацион месячных крольчат, и в течение последующих 2 месяцев следили за динамикой роста

молодняка, еженедельно взвешивая животных. Павших и заболевших животных за период наблюдений не отмечено. Двигательная активность, стул и состояние шерсти были нормальными. При вскрытии лабораторных животных после окончания эксперимента никаких патологических изменений в системах и органах не выявлено.

Для совместного твердофазного культивирования штаммов *B. subtilis* B-8130 с выделенным штаммом Rb или с коллекционным *E. faecium* B-8251 получали жидкие 2-суточные культуры бациллы на глюкозо-пептонной среде [6], а энтерококков – на 0.5%-ном молоке. Далее смешивали стерильный субстрат (“Геркулес”) с жидкими культурами (*B. subtilis* B-8130 и Rb либо *B. subtilis* B-8130 и *E. faecium* B-8251) в соотношении 2 : 1 : 1 (вес/объем). Полученной влажной массой полностью заполняли полиэтиленовые пакеты и инкубировали в условиях ограниченного доступа воздуха в течение 2 сут. Готовый продукт тестировали микроскопией на отсутствие посторонних бактерий и грибов и высушивали по способу, описанному выше.

Количество клеток в препаратах оценивали по методу Виноградского–Брида [9], подсчитывая клетки в окрашенных карболовым генцианвиолетом мазках площадью 1 см², с нанесенными 20 мкл разведенной в 100–200 раз суспензии, полученной при встряхивании 10 г массы в 100 мл стерильного физраствора с добавлением 10% речной гальки. Определяли рН в суспензии, полученной после разведения 5 г продукта твердофазной ферментации в 15 мл воды.

Результаты обрабатывали статистически с помощью программ MS Excel и Statistika (критерий Манна–Уитни). Для построения графиков использовали MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали возможность твердофазного культивирования *E. faecalis* Rb совместно с бациллой *B. subtilis* 8130 на “Геркулесе”. Общее число клеток энтерококка *E. faecalis* Rb на 1 г препарата составило $3 \pm 0.7 \times 10^8$, бациллы – $1 \pm 0.3 \times 10^8$; рН 4.9. Полученный препарат ввели в рацион крольчат. Результаты представлены на рис. 2. Применение в кормах животных препарата положительно сказалось на динамике живой массы их тела. Масса тела опытных крольчат в конце эксперимента превысила контрольных более, чем на 15%. В середине периода кормления была прекращена подача препарата, что вызвало сниже-

ние темпа прироста массы тела опытных крольчат почти до показателей контрольных. Введение вновь препарата (через неделю после прекращения его подачи) в рацион вызвало повторное повышение массы тела опытных животных, что наглядно указало на необходимость пробиотика для развития крольчат в отсутствие матери.

Таким образом, выделенный из экскрементов крольчихи природный штамм *E. faecalis* Rb в сочетании с *B. subtilis* B-8130 оказывал стимулирующее влияние на рост и развитие крольчат.

Коллекционный штамм *E. faecium* B-8251 также способен развиваться на “Геркулесе” в твердофазных условиях совместно с *B. subtilis* B-8130. При этом число клеток энтерококка в препарате составило $1.5 \pm 0.4 \times 10^8$ клеток/г, бациллы – $4 \pm 0.8 \times 10^8$ клеток/г; pH 5.4. Результаты кормления крольчат представлены на рис. 3. Продукт совместного твердофазного культивирования *E. faecium* B-8251 и *B. subtilis* B-8130 по биологической эффективности не уступал препарату, содержащему *E. faecalis* Rb и *B. subtilis* B-8130, и позволил получить увеличение живой массы тела крольчат на 15.5%. На рис. 4 представлена динамика суточных привесов крольчат. Препарат существенно снизил амплитуду колебаний усредненных показателей суточных привесов животных. Опытные крольчата развивались более равномерно по сравнению с контрольными, что свидетельствует о стабилизации физиологических процессов пробиотическим препаратом.

Для оценки генетической безопасности разрабатываемых штаммов энтерококков проводили анализ генов вирулентности. На рис. 5 представлена картина электрофореза фрагментов генов вирулентности. Сравнительные показатели суммированы в таблице. Согласно литературным сведениям большинство штаммов *E. faecalis* обладают набором генов, определяющих факторы вирулентности: *agg* – ответственный за адгезию к поверхности клеток эукариот, клеточную агрегацию и коньюгацию, *gelE* – за синтез токсина, внеклеточной металлоэндопептидазы, гидролиз желатины, коллагена, гемоглобина и других биоактивных соединений, *cylA* – за активацию цитолизина, *efaAfs* – за экспрессию адгезинов клеточной стенки [21]. Коллекционный штамм *E. faecalis* B-4610 (положительный контроль) обладал всеми отмеченными генами, у коллекционного штамма *E. faecium* B-8251 (отрицательный контроль) – гены вирулентности не обнаружены, что соответствовало литературным данным [4]. Штамм *E. faecalis* Rb содержал характерные для

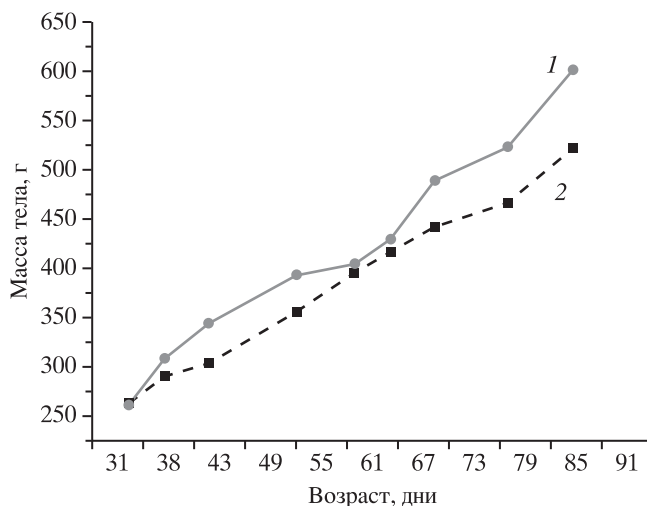


Рис. 2. Динамика живой массы тела крольчат на рационе с *E. faecalis* Rb и *B. subtilis* B-8130: 1 – опыт, 2 – контроль.

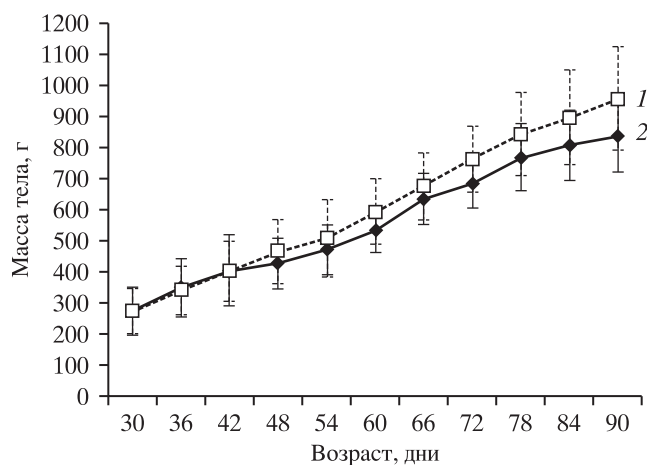


Рис. 3. Динамика живой массы тела крольчат на рационе с препаратом, содержащим *E. faecium* B-8251 и *B. subtilis* B-8130: 1 – опыт, 2 – контроль.

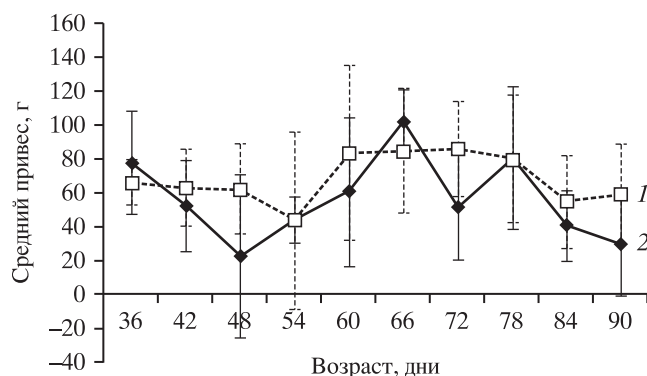


Рис. 4. Динамика суточных привесов тела крольчат на рационе с препаратом, содержащим *E. faecium* B-8251 и *B. subtilis* B-8130: 1 – опыт, 2 – контроль.

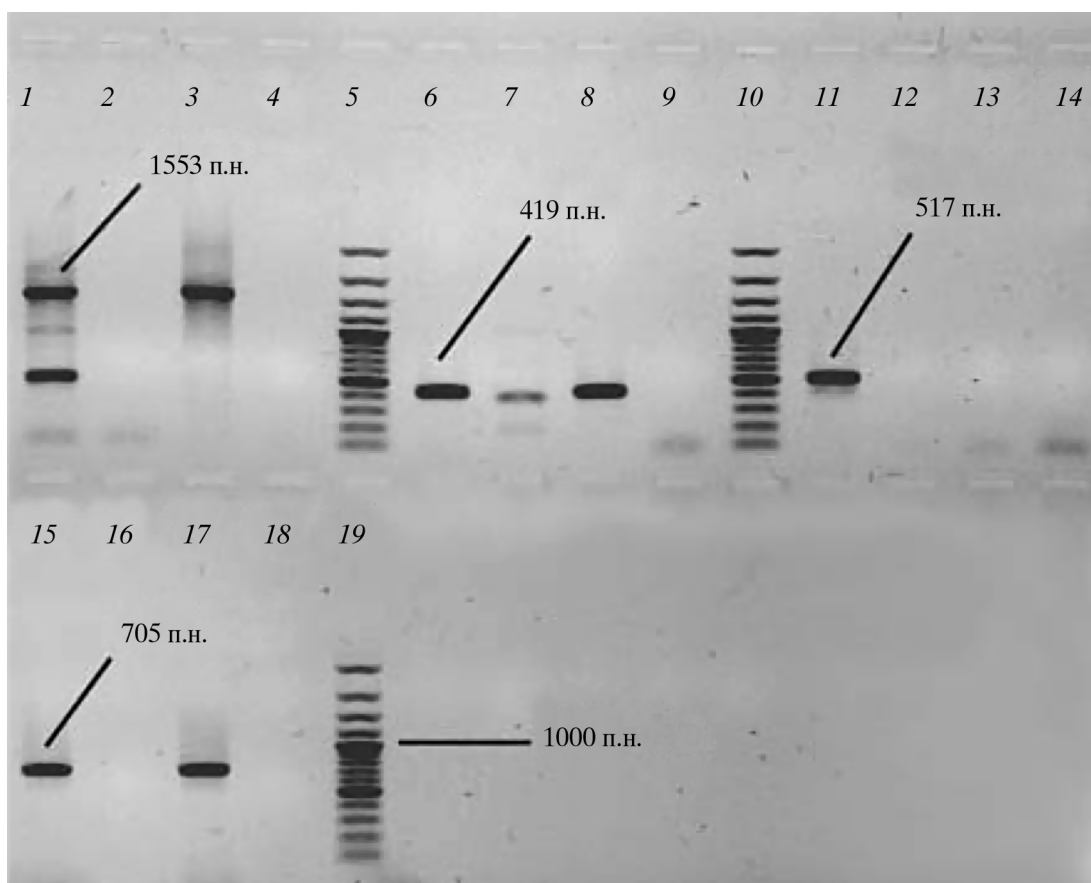


Рис. 5. Электрофорез фрагментов генов вирулентности: 1–5 – смесь праймеров TE3-TE4 ген *agg*: 1 – *E. faecalis* B-4610, 2 – *E. faecium* B-8251, 3 – Rb, 4 – контроль (без ДНК), 5 – GeneRuler™ GeneRuler™ 100+ п.н. ДНК-маркер (“Хеликон”, каталожный номер SM0321); 6–10 – смесь праймеров TE 9-TE10 ген *gelE*: 6 – *E. faecalis* B-4610, 7 – *E. faecium* B-8251, 8 – Rb, 9 – контроль (без ДНК), 10 – GeneRuler™ 100+ п.н. ДНК-маркер (“Хеликон”, каталожный номер SM0321); 11–14 – смесь праймеров TE17-TE18 ген *cyla*: 11 – *E. faecalis* B-4610, 12 – *E. faecium* B-8251, 13 – Rb, 14 – контроль (без ДНК); 15–19 – смесь праймеров TE5-TE6 ген *efaAfs*: 15 – *E. faecalis* B-4610, 16 – *E. faecium* B-8251, 17 – Rb, 18 – контроль (без ДНК), 19 – GeneRuler™ 100+ п.н. ДНК-маркер (“Хеликон”, каталожный номер SM0321).

E. faecalis гены *agg*, *gelE*, *efaAfs*, хотя отсутствовал ген *cyla*.

Присутствие у *E. faecalis* Rb набора генов вирулентности явилось фактором, ограничивающим его использование. Поэтому при выборе штамма для разработки пробиотического препарата целесообразно применять коллекционный штамм *E. faecium* B-8251, не содержащий обсуждаемых генов и показавший совместимость с *B. subtilis* B-8130 при твердофазном культивировании. Полученный продукт совместной ферментации

B. subtilis B-8130 и *E. faecium* B-8251 обладал биологической активностью при длительном скармливании крольчатам, стабилизируя обменные процессы и способствуя увеличению массы тела, и перспективен для дальнейших исследований.

Можно отметить, что кишечные энтерококки играют важную роль в росте и развитии животного организма, что и определяет эффективное применение этих бактерий в составе пробиотических препаратов нового поколения [3]. Отсутствие патологических нарушений у животных, получавших условно патогенный штамм *E. faecalis* Rb, и эволюционно закрепленный механизм передачи данного микроорганизма от матери детенышам свидетельствует о биологической целесообразности присутствия штамма в кишечном микробиоценозе. Однако в составе биопрепарата возможно использование только биологически активных метаболитов при отсутствии клеток бактерий.

Идентифицированные гены вирулентности

Микроорганизм	<i>agg</i>	<i>gelE</i>	<i>cyla</i>	<i>efaAfs</i>
<i>E. faecalis</i> B-4610	+	+	+	+
<i>E. faecium</i> B-8251	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i> Rb	+	+	–	+

Штамм *E. faecalis* Rb передан в ГосНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты 07-04-00700а и 09-04-13535 офи_ц.

Авторы выражают благодарность сотруднику Центра “Биоинженерия” РАН Т.В. Колгановой за консультацию в определении генов вирулентности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алехина Г.Г., Суворов А.Н.* // Успехи современного естествознания. 2007. № 6. С. 36.
2. *Бондаренко В.М.* // Фарматека. 2005. Т. 20. № 115. С. 46.
3. *Бондаренко В.М., Суворов А.Н.* Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. М., 2007. С. 30.
4. *Ботина С.Г., Суходолец В.В.* // Биотехнология. 2005. № 2. С. 33.
5. *Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Турова Т.П., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф.* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 500.
6. *Герхард Ф.* Методы общей бактериологии. М.: Мир. 1984. Т. 3. С. 264 с.
7. *Егоров Н.С., Баранова И.П.* // Антибиотики и химиотерапия. 1999. № 6. С. 33.
8. *Котенкова Е.В., Федосов Е.В., Ушакова Н.А.* // Успехи соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 1. С. 104.
9. *Герхард Ф.* Практикум по микробиологии. М.: Изд-во МГУ. 1976. С. 92.
10. *Суворов А.Н., Алехина Г.Г.* // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2009. № 4. С. 38.
11. *Урсова Н.И.* // *Consilium-medicum*. 2003. Т. 5. № 6. С. 27.
12. *Ушакова Н.А.* // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М.: КМК. 2005. С. 473–479.
13. *Ушакова Н.А., Наумова Е.И., Павлов Д.С., Чернуха Б.А.* Способ получения биологически активной кормовой добавки из растительного сырья. RU 2202224, С1 от 20.04.2003.
14. *Ушакова Н.А., Феоктистова Н. Ю., Колганова Т. В., Турова Т. П.* // Прикл. биохим. и микробиол. 2004. Т. 40. № 6. С. 639–644.
15. *Ушакова Н.А., Котенкова Е.В., Козлова А.А., Нифатов А.В.* // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 52. № 3. С. 285.
16. *Ушакова Н.А., Павлов Д.С., Чернуха Б.А., Кочелев Ю.А., Козлова А.А., Нифатов А.В.* Способ получения биологически активной кормовой добавки. Патент РФ № 2346463, приоритет от 20.03.2007.
17. *Ушакова Н.А., Федосов Е.В., Козлова А.А., Котенкова Е.В.* // Докл. АН, 2008. Т. 423. № 1. С. 136.
18. *Ушакова Н.А., Бродский Е.С., Козлова А.А., Нифатов А.В.* // Прикл. биохим. и микробиол. 2009. Т. 45. № 1. С. 70.
19. *Birnboim H. C., Doly J.* // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 7. № 6. P. 1513.
20. *Demaux G., Gallouin F., Guemon L., Papantonakis C.* // *Reprod. Nutr. Dev.* 1980. V. 20. № 5B. P. 1651.
21. *Eaton T.J., Gasson M.J.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 4. P. 1628.
22. *Giraffa G.* // *Food Microbiol.* 1995. V. 12. № 4. P. 291.
23. *Joosten N., Nunes M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 4. P. 1178.
24. *Joosten H., Nunes M., Devreese B. et al.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 6. № 11. P. 4220.

Development of Probiotic Preparation for Animals with Using the *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* Association

N. A. Ushakova¹, E. V. Kotenkova¹, A. A. Kozlova¹, E. V. Fedosov¹, R. V. Baslerov²

¹ *A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow,*

² *The center “Bioengineering” of the Russian Academy of Science, Moscow*

The bases of the creation a probiotic preparation for animals with the use of the *Bacillus subtilis* and *Enterococcus* association are developed. The opportunity of the joint solid-state fermentation of intestinal enterococci (allocated from the mother-rabbit *Enterococcus faecalis* Rb strain and the collection *E. faecium* B-8251 strain) with *Bacillus subtilis* B-8130 on oat flakes is shown. The preparations obtained that contained the bacterial cells stimulated the development of young rabbits on the introduction of the preparation into their diet. The *E. faecalis* Rb strain contained characteristic for *E. faecalis* virulent genes *agg*, *gelE* and *efaAfs*, that restricts in probiotic preparations. In cells *E. faecium* B-8251 cells, the genes discussed were not found. The product of the joint solid-state fermentation using *B. subtilis* B-8130 and *E. faecium* B-8251 that was used for feeding of young animals stabilized metabolic processes and promoted the increase of the animal body mass. The proposed composition is perspective for further studies.